

云南古茶园栽培大叶茶和大理茶群体的叶绿体 *RPL32-TRNL* 核苷酸变异和遗传分化^{*}

刘 阳^{1,2}, 杨世雄³, 高立志^{1**}

(1 中国科学院昆明植物研究所植物种质资源与基因组学研究中心, 云南 昆明 650204;

2 中国科学院研究生院, 北京 100049; 3 中国科学院昆明植物研究所

生物多样性与生物地理学重点实验室, 云南 昆明 650204)

摘要: 对云南地区栽培的大叶茶 (*Camellia sinensis* var. *assamica*) 9 个居群和大理茶 (*C. taliensis*) 3 个居群的遗传多样性和居群遗传结构进行了比较研究。通过对 94 条叶绿体 DNA *RPL32-TRNL* 序列的核苷酸序列变异进行分析, 共发现了 7 个单倍型。研究表明, 大叶茶 ($h=0.728$, $\pi=0.00469$) 比大理茶 ($h=0.610$, $\pi=0.00225$) 拥有更为丰富的遗传变异, 但其居群遗传分化水平 ($G_{st}=0.580$, $F_{ST}=0.612$) 却低于大理茶 ($G_{st}=0.696$, $F_{ST}=0.773$)。AMOVA 分析进一步证实了它们的遗传变异主要存在于居群间, 且大叶茶 (61.21%) 低于大理茶 (77.34%)。相对于大理茶, 遗传多样性水平在本研究所取的大叶茶居群间存在着较大的差异, 单倍型多态性水平变化范围为 0~0.809, 核苷酸多态性水平变化范围为 0~0.00487。最后, 讨论并提出了科学有效地保护我国古茶园茶种资源的建议和对策。

关键词: 大叶茶; 大理茶; 叶绿体 DNA; 遗传多样性; 古茶园; *RPL32-TRNL*

中图分类号: Q 16

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700(2010) 05-427-08

Comparative Study on the Chloroplast *RPL32-TRNL* Nucleotide Variation within and Genetic Differentiation among Ancient Tea Plantations of *Camellia sinensis* var. *assamica* and *C. taliensis* (Theaceae) from Yunnan, China

LIU Yang^{1,2}, YANG Shi-Xiong³, GAO Li-Zhi^{1**}

(1 Plant Germplasm and Genomics Center, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences,

Kunming 650204, China; 2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3 Key Laboratory of Biodiversity and Biogeography, Kunming Institute of Botany,

Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: In order to assess genetic diversity and population structure, nine *Camellia sinensis* var. *assamica* and three *C. taliensis* populations from Yunnan, China were evaluated. Based on nucleotide variation of 94 cpDNA *RPL32-TRNL* sequences, a total of seven distinct haplotypes were detected in the studied populations. It was apparent that *C. sinensis* var. *assamica* ($h=0.728$, $\pi=0.00469$) possessed higher levels of genetic diversity than *C. taliensis* ($h=0.610$, $\pi=0.00225$). However, genetic differentiation among populations of *C. sinensis* var. *assamica* ($G_{st}=0.580$, $F_{ST}=0.612$) was lower than that among *C. taliensis* pop-

^{*} 基金项目: 中国科学院昆明植物研究所“百人计划”引进人才启动项目 (510602511121); 昆明植物研究所创新三期领域前沿重点项目 (672705232515); 云南省自然科学基金重点项目 (2008CC016); 中国科学院“百人计划”择优支持项目; 云南省高端科技人才引进项目 (20080A009); 国家自然科学基金 NSFC-云南联合基金项目 (U0936603)

^{**} 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: lgao@mail.kib.ac.cn

收稿日期: 2010-04-12, 2010-06-09 接受发表

作者简介: 刘阳 (1984-) 男, 硕士研究生, 从事栽培茶树及其野生近缘植物的群体遗传学和保护生物学研究。

ulations ($G_{st}=0.696$, $F_{ST}=0.773$). Our AMOVA analysis further revealed that the majority of variation was partitioned among populations of the two taxa, while *C. sinensis* var. *assamica* (61.21%) showed lower level of genetic differentiation than *C. taliensis* (77.34%). In comparisons to *C. taliensis*, genetic diversity within *C. sinensis* var. *assamica* largely varied among populations, ranging from 0 to 0.809 and from 0 to 0.00487 for haplotype and nucleotide diversity, respectively. Conservation strategies were finally discussed and proposed to efficiently protect ancient tea plantations in China.

Key words: *Camellia sinensis* var. *assamica*; *Camellia taliensis*; cpDNA; Genetic diversity; Ancient tea plantations; *RPL32-TRNL*

茶 (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) 作为世界三大饮料植物之一, 在分类学上属于山茶科 (Theaceae) 山茶属 (*Camellia*) 之茶组 (sect. *Thea*)。在茶组植物 12 个种中, 仅有茶 (*C. sinensis*) 这一种在世界范围内被广泛栽培 (闵天禄, 2000); 但在亚洲的部分地区, 尤其是我国的云南, 大理茶 (*C. taliensis*) 和厚轴茶 (*C. crassicolumna*) 等茶组植物也被当地居民长期引种栽培 (陈进和裴盛基, 2003)。

民族植物学及语言学证据表明, 云南及其邻近地区的原住民有着悠久的种植和利用茶叶的历史 (陈进和裴盛基, 2003)。至今, 在云南的临沧、普洱和西双版纳等地区, 还保存有大量明、清时代建立的古茶园, 其中种植的茶树主要为大叶茶 (*C. sinensis* var. *assamica*)。作为茶 (*C. sinensis*) 的重要野生近缘种, 大理茶 (*C. taliensis*) 与大叶茶在形态特征上十分相似, 主要区别在于顶芽、幼枝和叶片均无毛, 花柱 5 裂, 无毛, 子房 5 室, 被绒毛。野生大理茶居群主要分布在我国云南西部、西南部和毗邻的缅甸北部、泰国北部 (闵天禄, 2000)。此外, 在澜沧江流域地区也零星分布有少量的栽培大理茶古茶园。这些珍贵的古茶园不仅为栽培茶树的起源驯化研究提供了丰富的素材, 也是未来进行茶树遗传改良不可多得的宝贵基因来源。

近几十年来, 由于大面积毁林开荒、工程建设破坏以及单一化现代茶园替代, 加之对古茶树进行砍伐和过度采摘的事件屡屡发生, 导致古茶园面积急剧减少。云南古茶园种质资源面临着严重的破坏和威胁, 因此加强对古茶园的保护刻不容缓。本研究利用叶绿体 DNA *RPL32-TRNL* 片段的序列变异对栽培大叶茶和大理茶居群进行了研究, 旨在评价栽培大理茶和大叶茶居群的遗传多样性和居群遗传结构, 阐明栽培大理茶与大

叶茶之间的进化关系, 为栽培古茶园种质资源的保护策略的制定提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本实验选取了在云南具有地理代表性的栽培大理茶 3 个居群和栽培大叶茶 9 个居群进行研究 (具体地理位置见表 1)。每个研究居群取 7~9 个树体高大的个体, 取样个体间至少间隔 10 m, 采集幼嫩叶片, 硅胶迅速干燥, 放置于自封袋中保存。茶组植物的种间存在着较高的杂交亲和性 (Takeda, 1990), 野外考察发现有些植株形态上介于大理茶和大叶茶之间, 这些个体可能为两者之间的杂交后代。为了更好地比较和追溯栽培的大理茶和大叶茶之间的居群进化历史, 本研究所选择的居群在形态上都能非常明显地区分两个分类单元, 不存在形态上的过渡性材料。凭证标本保存于中国科学院昆明植物所标本馆 (KUN)。

1.2 DNA 提取和 PCR 扩增

硅胶干燥的叶片采用改良的 CTAB 法 (唐玉海等, 2007) 提取总 DNA。PCR 引物序列依据 Shaw 等 (2007) 所述, 分别为 *TRNL* (5'-CTG CTT CCT AAG AGC AGC GT-3') 和 *RPL32* (5'-CAG TTC CAA AA A AAC GTA CTT C-3')。扩增反应在 50 μ l 反应体系中进行 (浓度均为终浓度): 1 $\times$ PCR buffer, 两端引物各 0.1 μ mol $\cdot$ L⁻¹, dNTPs 0.1 mmol $\cdot$ L⁻¹, *Taq* 聚合酶 0.5 U 以及约 50 ng 模板 DNA。扩增反应程序为: 97 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 52 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 32 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离, 割取目的条带, 用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒 (上海生工) 进行纯化, 纯化产物送至深圳华大基因研究院测序。测序引物为扩增引物, 利用正反向引物分别对两条链进行测序。

1.3 数据分析

利用软件 BIOEDIT (Hall, 1999) 对序列进行比对, 并加以手工调整。参照 Caicedo and Schaal (2004) 的方法, 将长度大于 1 个碱基的插入/缺失处理为单碱基的插入/缺失。所有的插入/缺失位点被视为第五碱基,

表1 研究居群的地理来源
Table 1 Geographical origins of the study populations

居群 Population	地理位置 Location	纬度 (N) Latitude	经度 (E) Longitude	分类单元 Taxon
JM	云南, 澜沧, 景迈 Jingmai, Lancang, Yunnan	22°33'	99°59'	大叶茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i>
YX	云南, 云县, 爱华镇 Aihua, Yunxian, Yunnan	24°26'	100°02'	大叶茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i>
ZY	云南, 镇沅, 山街 Shanjie, Zhenyuan, Yunnan	23°59'	100°37'	大叶茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i>
CN	云南, 昌宁, 澂水镇 Mangshui, Changning, Yunnan	24°56'	99°39'	大叶茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i>
SM	云南, 普洱, 倚象镇 Yixiang, Puer, Yunnan	24°35'	101°10'	大叶茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i>
CY	云南, 沧源, 单甲 Shanjia, Cangyuan, Yunnan	23°10'	99°28'	大叶茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i>
NNS	云南, 勐海, 南糯山 Nannuoshan, Menghai, Yunnan	21°59'	100°04'	大叶茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i>
JC	云南, 江城, 牛保河 Niuluohu, Jiangcheng, Yunnan	22°26'	101°52'	大叶茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i>
YW	云南, 勐腊, 易武 Yiwu, Mengla, Yunnan	21°29'	101°33'	大叶茶 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i>
TCNT	云南, 昌宁, 田园镇 Tianyuan, Changning, Yunnan	24°50'	99°35'	大理茶 <i>C. taliensis</i>
TDL	云南, 大理, 下关镇 Xiaguan, Dali, Yunnan	25°36'	100°11'	大理茶 <i>C. taliensis</i>
TDH	云南, 潞西, 江东镇 Jiangdong, Luxi, Yunnan	24°29'	98°21'	大理茶 <i>C. taliensis</i>

并进行了重新编码。运用 DNASP 4.10 (Rozas 等, 2003) 软件统计了叶绿体 DNA *RPL32-TRNL* 片段的单倍型, 并分别在分类单元水平和居群水平对核苷酸多态性 (π) (Nei and Li, 1979), 单倍型多态性 (h) 和分离位点数目 (S) 进行了检测。利用 DNASP 4.10 软件对居群间遗传分化系数 (G_{st}) 和居群间的平均基因流 (N_m) (Nei, 1973) 进行了估算。利用 TCS1.2 软件 (Clement 等, 2000) 构建了 cpDNA *RPL32-TRNL* 片段的单倍型网络图。这种方法应用溯祖理论 (coalescent theory) 来推测单倍型的亲缘关系, 基于统计简约性产生单倍型网状关系并保存了单倍型之间 95% 的最简约节点。

应用 ARLEQUIN 3.0 (Excoffier 等, 2005) 对分类单元和居群进行遗传结构的分子方差分析 (AMOVA, analysis of molecular variance) (Excoffier 等, 1992)。运用 ARLEQUIN 3.0 软件包中的 Mantel 统计学检验 (Mantel, 1967), 分别对栽培大叶茶和大理茶的居群间遗传分化系数 F_{st} 与地理距离之间的相关性进行了检验。

2 结果

2.1 序列变异分析

对 12 个居群 94 个个体的 cpDNA *RPL32-TRNL* 非编码区片段进行了测序, 比对后序列长度为 930 bp, 共检测到 7 种不同的单倍型。通过对单倍型序列间进行比对, 共发现了 14 个变异位点 (表 2), 包括 10 处碱基替换 (substitutions) 和 4 处插入/缺失 (indels)。其中 10 处替换分别为: 在 166 bp ($T \leftrightarrow C$)、285 bp ($A \leftrightarrow G$)、356 bp ($A \leftrightarrow G$)、549 bp ($A \leftrightarrow G$)、689 bp ($T \leftrightarrow C$) 和 727 bp ($A \leftrightarrow G$) 处各有一个碱基转换 (transition)、在 145 bp ($T \leftrightarrow G$)、476 bp ($C \leftrightarrow G$)、579 bp ($C \leftrightarrow G$) 和 703 bp ($A \leftrightarrow C$) 处各有一个碱基颠换 (transversion); 4 处插入/缺失分别为: 65 bp 和 138 bp 处的单碱基的插入/缺失、247~277 bp (31 bp) 之间和 288~289 bp (2 bp) 之间的多碱基的插入/缺失。

表2 叶绿体 DNA *RPL32-TRNL* 片段7种单倍型间的序列变异位点
Table 2 Variable sites within the aligned sequences of the cpDNA *RPL32-TRNL* intergenic fragments in the seven haplotypes

单倍型 Haplotype	变异位点 Variable sites													
	65	138	145	166	247	285	288	356	476	549	579	689	703	727
H1	—	—	T	T	—	G	—	G	C	A	C	C	A	G
H2	T	—	G	T	—	G	—	G	C	A	C	C	C	G
H3	—	—	T	T	—	G	—	G	C	G	C	C	A	A
H4	—	A	T	C	#	A	—	A	G	A	C	C	A	G
H5	—	—	G	T	—	G	—	G	C	A	C	C	A	G
H6	—	—	T	C	#	A	*	A	G	A	G	C	A	G
H7	—	—	T	T	—	G	—	G	C	A	C	T	A	G

TTACTAAATTCTAAAAAATACTTTTCTTT; * AA

2.2 遗传多样性分析

利用 TCS1.2 软件构建了 cpDNA *RPL32-TRNL* 的单倍型网络图 (图 1)。位于分支内部的古老单倍型 H1 分布在大叶茶 5 个居群和大理茶 2 个居群中, 为分布范围最广、出现频率最高 (36.2%) 的单倍型。位于分支末端的单倍型 H4 在大叶茶 6 个居群中都有分布, 是大叶茶中分布范围最广、出现频率最高的单倍型。单倍型 H1 和 H6 为大理茶和大叶茶两个分类单元所共有, 单倍型 H2、H3、H4 和 H5 四种单倍型只出现在大叶茶居群中, 而单倍型 H7 仅分布在大理茶居群中。单倍型 H5 和 H7 与单倍型 H1 间都仅存在一个碱基的差异, 其中单倍型 H5 仅含有来自居群 YX 中 2 条序列; 单倍型 H7 中的 9 条

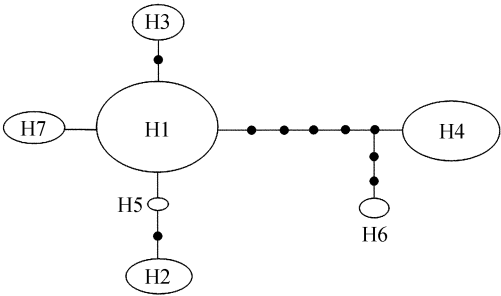


图 1 叶绿体 *RPL32-TRNL* 基因片段的单倍型网络图
Fig. 1 Haplotype network of the cpDNA *RPL32-TRNL* intergenic fragments

序列则全部来自于大理茶居群 TDH (表 3)。

遗传多样性的分析结果表明 (表 3), 栽培大叶茶的单倍型多态性水平 ($h=0.728$) 和核苷酸多态性水平 ($\pi=0.00469$) 均高于栽培大理茶 ($h=0.610$, $\pi=0.00225$)。栽培大叶茶居群间的遗传多样性水平也存在较大差异, 单倍型多态性水平 (h) 变化范围为 $0\sim0.809$, 而核苷酸多态性水平 (π) 变化范围为 $0\sim0.00487$ 。其中, 居群 JM 的单倍型多态性水平 ($h=0.809$) 和核苷酸多态性水平 ($\pi=0.00487$) 最高, 而居群 NNS、JC 和 YW 中都只含有一种单倍型, 单倍型多态性水平和核苷酸多态性水平均为零。而在栽培大理茶中, 除居群 TDL ($h=0.500$, $\pi=0.00389$) 外, 其余两个居群 (TCNT 和 TDH) 的单倍型多态性水平和核苷酸多态性水平均为零。

2.3 居群遗传结构分析

居群遗传结构分析结果表明, 栽培大叶茶和栽培大理茶的居群间均存在着较高水平的遗传分化, 栽培大理茶的居群遗传分化系数 ($G_{st}=0.696$) 高于栽培大叶茶 ($G_{st}=0.580$)。栽培大叶茶和栽培大理茶的 N_m 值分别为 0.18 和 0.11, 表明它们居群间的基因流受阻。

AMOVA 分析结果表明 (表 4), 遗传变异主要存在于分类单元内居群间, 高达 60.12%; 分类

表3 单倍型分布和遗传多样性指数
Table 3 Haplotype distribution and measures of genetic diversity

居群 Populations	单倍型在不同居群中的分布 Distribution of haplotypes in different populations											
	n	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	S	H	h	π
JM	7	1	3	2	1				11	4	0.809	0.00487
YX	7				5	2			7	2	0.476	0.00371
ZY	8	4			4				6	2	0.571	0.00381
CN	8				7		1		3	2	0.250	0.00083
SM	7	6			1				6	2	0.286	0.00191
CY	7	2		5					2	2	0.476	0.00106
NNS	9				9				0	1	0.000	0.00000
JC	8		8						0	1	0.000	0.00000
YW	8	8							0	1	0.000	0.00000
<i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i>	69	21	11	7	27	2	1		13	6	0.728	0.00469
TCNT	7	7							0	1	0.000	0.00000
TDL	9	6					3		7	2	0.500	0.00389
TDH	9							9	0	1	0.000	0.00000
<i>C. taliensis</i>	25	13					3	9	8	3	0.610	0.00225

n: 序列条数, S: 分离位点数目, H: 单倍型数, h: 单倍型多态性, π : 核苷酸多态性
n-number of sequences; S-number of segregating sites; H-number of haplotypes; h-haplotype diversity; π -nucleotide diversity

表4 大叶茶和大理茶居群的 AMOVA 分析
Table 4 AMOVA analysis of *C. sinensis* var. *assamica* and *C. taliensis* populations

变异来源 Source of variation	自由度 DF	平方和 Sum of squares	变异组分 Variance components	变异百分比 Percentage of variation (%)	固定指数 Fixation Index *	P 值 P value
分类单元间 Among taxa	1	3.458	0.03364	7.99	$F_{CT}=0.080$	0.19062
分类单元内居群间 Among populations within taxa	10	21.056	0.25325	60.12	$F_{SC}=0.653$	<0.0001
居群内 Within populations	82	11.018	0.13436	31.90	$F_{ST}=0.681$	<0.0001
总计 Total	93	35.532	0.42126			
大叶茶居群 <i>C. sinensis</i> var. <i>assamica</i> populations group						
居群间 Among populations	8	15.736	0.23718	61.21	$F_{ST}=0.612$	<0.0001
居群内 Within populations	60	9.018	0.15030	38.79		
总计 Total	68	24.754	0.38748			
大理茶居群 <i>C. taliensis</i> populations group						
居群间 Among populations	2	5.320	0.31028	77.34	$F_{ST}=0.773$	<0.0001
居群内 Within populations	22	2.000	0.09091	22.66		
总计 Total	24	7.320	0.40119			

* 在两个分类单元的联合分析中， F_{CT} 指分类单元间遗传变异的固定指数， F_{SC} 指分类单元内居群间遗传变异的固定指数， F_{ST} 指分类单元内居群间遗传变异的固定指数

* In the combining AMOVA analysis of *C. sinensis* var. *assamica* and *C. taliensis* populations, F_{CT} indicates the fixation index of genetic variation between taxa, F_{SC} shows the fixation index of genetic variation among populations within taxa, and F_{ST} means the fixation index of genetic variation among populations among taxa

单元间遗传变异仅为 7.99%，居群内的遗传变异为 31.90%。分类单元间居群间遗传变异固定指数 F_{ST} 和分类单元内居群间遗传变异固定指数 F_{SC} 分别为 0.681 和 0.653，均达到极显著水平 ($P<0.001$)，表明分类单元间居群间和分类单元内居群间遗传分化水平较高。分类单元间遗传变异固定指数 $F_{CT}=0.080$ ($P>0.05$)，表明栽培大理茶和栽培大叶茶之间不存在明显的遗传分化。栽培大理茶居群内的遗传变异水平 (22.66%) 低于栽培大叶茶 (38.79%)，栽培大理茶居群间遗传变异固定指数 ($F_{ST}=0.773$, $P<0.001$) 高于栽培大叶茶 ($F_{ST}=0.612$, $P<0.001$)，表明栽培大理茶和栽培大叶茶居群间均存在着显著的遗传分化。Mantel 检验结果表明栽培大叶茶 ($r=0.225$, $P>0.05$) 和栽培大理茶 ($r=0.416$, $P>0.05$) 的居群间遗传分化系数 F_{st} 与地理距离之间均不存在着显著的相关性。

3 讨论

3.1 遗传多样性和居群遗传结构分析

叶绿体基因组常被看作是一个独立的遗传单

位，不经受遗传重组，有利于进行遗传分析 (Schaal 等, 1998)。尤其是叶绿体基因组上的一些非编码区域具有较快的进化速率，能区分出种内多种单倍型，适合于植物近缘种间和种内的亲缘关系和遗传多样性研究，如 Katoh 等 (2003) 通过对来自 8 个国家的 118 份茶树种质资源的叶绿体 DNA *matK* 非编码区域序列的比较，得到了 10 种不同的叶绿体单倍型。Shaw 等 (2007) 对不同植物叶绿体基因组上的 34 个非编码区域的序列进行了比较，发现 *RPL32-TRNL* 区域的变异最为丰富，非常适于较低分类单元的亲缘关系研究 (Falchi 等, 2009; Sosa 等, 2009)。Petit 等 (2005) 收集了不同植物居群的遗传多样性资料，得到了植物平均 cpDNA 遗传多样性 ($H_t=0.67$)。本研究对来自 94 个个体的 *RPL32-TRNL* 序列进行了分析，发现栽培大叶茶的单倍型多态性水平 ($h=0.728$) 高于植物平均 cpDNA 的遗传多样性水平，而栽培大理茶的单倍型多态性水平 ($h=0.610$) 低于平均 cpDNA 的遗传多样性水平 (Petit 等, 2005)。

前人利用不同的分子标记手段，对不同地区的茶树种质资源的居群遗传结构进行了研究，大多数的分析结果显示茶树种质资源居群间的遗传

分化程度较低。如 Kaundun 和 Park (2002) 利用 RAPD 标记对韩国西南地区茶树 (*C. sinensis* var. *sinensis*) 6 个居群进行分析, 得到的居群间遗传分化系数 G_{st} 为 0.183; 季鹏章等 (2007) 运用 ISSR 对云南地区的大叶茶 (*Camellia sinensis* var. *assamica*) 10 个居群进行了研究, 结果显示大叶茶居群间遗传分化系数 G_{st} 为 0.391; Ohsako 等 (2008) 利用 SSR 标记对日本京都地区茶树 (*C. sinensis* var. *sinensis*) 地方品种 8 个居群进行研究, 结果同样表明居群间的遗传分化程度较低, G_{st} 仅为 0.062。与前人研究结果相比, 本研究发现栽培大叶茶和栽培大理茶居群间均表现出较高的遗传分化水平, 居群间遗传分化系数 G_{st} 分别达到 0.580 和 0.696, 也远远高于山茶科中其它物种的居群间遗传分化水平。罗晓莹等 (2005) 利用 RAPD 对山茶科 3 种濒危植物猪血木 (*Euryodendron excelsum*)、圆籽荷 (*Apterosperma oblate*) 和杜鹃红山茶 (*Camellia changii*) 的居群遗传结构进行了研究, 发现居群间遗传分化指数 G_{st} 分别为 0.3566、0.1713 和 0.1242。与上述主要利用核基因组上的遗传标记对居群遗传结构进行研究相比, 本研究则是基于叶绿体基因组的核苷酸变异对栽培大叶茶和栽培大理茶的居群遗传结构进行分析。由于叶绿体基因组的有效群体大小 (effective population size) 远小于核基因组, 遗传漂变对叶绿体基因组居群遗传结构的作用更为强烈。因此, 基于叶绿体基因组核苷酸变异的检测往往表现出更高的居群分化水平 (Schaal 等, 1998)。

叶绿体基因组在绝大多数被子植物中为母系遗传, 其叶绿体基因组只能通过种子进行传播, 能真实地反映由于种子扩散而引起的遗传结构差异 (陈生云等, 2008)。本研究中的 AMOVA 分析结果显示, 栽培大叶茶 (61.21%) 和栽培大理茶 (77.34%) 的遗传变异都主要存在于居群间, 居群间遗传变异指数 F_{ST} 分别为 0.612 ($P < 0.001$) 和 0.773 ($P < 0.001$), 显示出居群间存在较高程度的遗传分化。同时, 我们也发现栽培大理茶和栽培大叶茶居群间的平均基因流分别仅为 0.18 和 0.11, 而造成这种居群间基因流受阻的主要原因可能是由于种子传播的距离相对有限, 导致居群间的种子流水平较低, 进一步加

剧了居群间的遗传分化。

与野生植物相比, 栽培植物的遗传结构更容易受到人类活动的影响。对古茶园而言, 其遗传结构的组成在很大程度上取决于古茶园建立初期的种子来源, 而人类对种子的选取很可能带有很大的随意性。近几十年来, 人类活动的影响使得古茶园居群面积急剧减少, 导致遗传漂变作用增强, 进一步加快了居群遗传结构的改变和遗传多样性的随机丢失。Mantel (1967) 的检验结果表明栽培大叶茶和大理茶的居群间遗传分化系数 F_{st} 与空间距离之间均没有显著的相关性, 这极有可能就反映了人类活动对古茶园居群遗传结构的影响。

3.2 栽培大理茶与栽培大叶茶之间的进化关系

AMOVA 分析结果表明大理茶和大叶茶两个分类单元间的遗传变异仅为 7.99%, 分类单元间遗传变异固定指数 $F_{CT} = 0.080$ ($P > 0.05$), 表明栽培大理茶和大叶茶之间不存在明显的遗传分化。单倍型网络图 (图 1) 中可以看出栽培大理茶和大叶茶共享的单倍型既有位于网络内部的古老单倍型 (H1), 也有位于网络末端的进化上年轻的单倍型 (H6)。造成这种共享单倍型的在网络图上分布式样的主要原因可能有: (1) 在物种分化时存在不完全的谱系分选, 使得古老单倍型在大理茶和大叶茶中都得到保留; (2) 栽培大理茶和大叶茶之间可能存在比较频繁的杂交和基因流, 进而实现了单倍型在大理茶和大叶茶之间的交流。通过对 cpDNA 的单倍型谱系关系分析, 同样表明栽培大理茶和大叶茶之间在母系遗传谱系上不存在明显的遗传分化。

茶组植物间十分容易杂交, 而古茶园周围往往存在小叶茶 (*C. sinensis* var. *sinensis*) 等茶组植物, 因此栽培大理茶和大叶茶居群极可能与周围的茶组植物之间存在着广泛的基因渗入。基因渗入不仅会造成居群间的单倍型组成差异, 而且使得栽培大理茶和大叶茶之间的进化关系更为错综复杂。因此, 需要今后对茶组植物进行更为全面的取样和深入的分析, 以期对栽培大理茶和大叶茶之间的进化关系有一个更为清晰的认识。

3.3 古茶园的 protection 建议

物种的遗传变异水平和群体遗传结构是在物种的内部因素 (如繁育系统) 和外部因素 (如选

择作用) 两方面共同作用下形成的, 与物种的适应性和进化潜力密切相关 (Schaal 等, 1998)。对物种遗传多样性及其居群遗传结构的研究是制定并实施有效保护策略的理论依据。本研究中居群遗传结构分析表明, 栽培大理茶和栽培大叶茶的 cpDNA *RPL32-TRNL* 片段的遗传变异都主要存在于居群间, 并且栽培大理茶和栽培大叶茶居群间都表现出较高的遗传分化。同时, 考虑到茶组植物自交不亲和的繁育特性, 往往会导致居群内核基因组遗传组成的高度杂合, 进而使得核基因组遗传变异主要存在于居群内 (Kaundun and Park, 2002; Ohsako 等, 2008; 季鹏章等, 2007)。

因此, 结合古茶园叶绿体和核基因的遗传变异特点, 我们建议古茶园的保护应以原位保护为主, 对于遗传多样性水平较高的居群如 JM、ZY、CY 和 TDL 等居群应予以优先保护; 在迁地保护采样过程中, 应尽量增加对古茶园居群内个体的取样数目, 保证在每个居群内取足够多的个体; 由于居群间存在显著的遗传分化, 对个别居群的保护很难涵盖整个物种的遗传多样性, 因此应对尽可能多的居群实施保护, 最大限度地保护古茶园的遗传多样性; 考虑到栽培大理茶居群中含有独特的单倍型, 并且大理茶中往往具备许多优异性状 (如抗寒性强、抗病性强) (唐一春等, 2009), 可以为茶树的品种选育和遗传改良提供宝贵的遗传材料, 因此更应加强对栽培大理茶居群的保护。

致谢: 云南省农业科学院茶叶研究所季鹏章博士为本研究提供了部分实验材料, 徐平珍、樊亚宇、朱婷和吴永胜在实验中给予了帮助。

〔参 考 文 献〕

- 闵天禄, 2000. 世界山茶属的研究 [M]. 昆明: 云南科技出版社
- Caicedo AL, Schaal BA, 2004. Population structure and phylogeography of *Solanum pimpinellifolium* inferred from a nuclear gene [J]. *Molecular Ecology*, **15** (12): 1871—1882
- Chen J (陈进), Pei SJ (裴盛基), 2003. Studies on the origin of tea cultivation [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **Suppl. XIV**: 33—40
- Chen SY (陈生云), Wu GL (吴桂莉), Zhang DJ (张得钧) *et al.*, 2008. Molecular phylogeography of alpine plant *Metagentiana striata* (Gentianaceae) [J]. *Journal of Systematics and Evolution*, **46** (4): 573—585
- Clement M, Posada D, Crandall KA, 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies [J]. *Molecular Ecology*, **9** (10): 1657—1659
- Excoffier L, Laval G, Schneider S, 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis [J]. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**: 47—50
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM, 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data [J]. *Genetics*, **131** (2): 479—491
- Falchi A, Paolini J, Desjober JM *et al.*, 2009. Phylogeography of *Cistus creticus* L. on Corsica and Sardinia inferred by the *TRNL-F* and *RPL32-TRNL* sequences of cpDNA [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **52** (2): 538—543
- Hall TA, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**: 95—98
- Ji PZ (季鹏章), Zhang J (张俊), Wang PS (王平盛) *et al.*, 2007. Genetic diversity of ancient tea plant in Yunnan Province of China revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymerase chain reaction [J]. *Journal of Tea Science* (茶叶科学), **27** (4): 271—279
- Katoh Y, Katoh M, Takeda Y *et al.*, 2003. Genetic diversity within cultivated teas based on nucleotide sequence comparison of ribosomal RNA maturase in chloroplast DNA [J]. *Euphytica*, **134** (3): 287—295
- Kaundun SS, Park YG, 2002. Genetic structure of six Korean tea populations as revealed by RAPD-PCR markers [J]. *Crop Science*, **42** (2): 594—601
- Lou XY (罗晓莹), Tang GD (唐光大), Xu H (许涵) *et al.*, 2005. Genetic diversity of three endemic and endangered species of the family Theaceae in Guangdong, China [J]. *Biodiversity Science* (生物多样性), **13** (2): 112—121
- Mantel N, 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach [J]. *Cancer Research*, **27** (2): 209—220
- Nei M, Li WH, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **76** (10): 5269—5273
- Nei M, 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **70** (12): 3321—3323
- Ohsako T, Ohgushi T, Motosugi H *et al.*, 2008. Microsatellite variability within and among local landrace populations of tea, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, in Kyoto, Japan [J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **55** (7):

- 1047—1053
- Petit RJ, Duminil J, Fineschi S *et al.*, 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations [J]. *Molecular Ecology*, **14** (3): 689—701
- Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X *et al.*, 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. *Bioinformatics*, **19** (18): 2496—2497
- Schaal BA, Hayworth DA, Olsen KM *et al.*, 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects [J]. *Molecular Ecology*, **7** (4): 465—474
- Shaw J, Lickey EB, Schilling EE *et al.*, 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III [J]. *American Journal of Botany*, **94** (3): 275—288
- Sosa V, Ruiz-Sanchez E, Rodriguez-Gomez FC, 2009. Hidden phylogeographic complexity in the Sierra Madre Oriental: the case of the Mexican tulip poppy *Hunnemannia fumariifolia* (Papaveraceae) [J]. *Journal of Biogeography*, **36** (1): 18—27
- Takeda Y, 1990. Cross compatibility of tea (*Camellia sinensis*) and its allied species in the genus *Camellia* [J]. *Japan Agricultural Research Quarterly*, **24** (14): 111—116
- Tang YC (唐一春), Yang SM (杨盛美), Ji PZ (季鹏章) *et al.*, 2009. Study on the diversity, utilization and protection of wild tea germplasm in Yunnan [J]. *SouthWest China Journal of Agricultural Sciences* (西南农业学报), **22** (2): 518—521
- Tang YH (唐玉海), Guo CF (郭春芳), Zhang MQ (张木清), 2007. A modified method for extracting genome DNA of tea-modified CTAB method [J]. *Journal of Fujian Institute of Education* (福建教育学院学报), **8** (1): 99—101

* * * * *

2011 年部分生物、农林类学术期刊联合征订表

刊物名称	邮发代号	刊期	年价(元)	期刊网址	编辑部 E-mail
癌变·畸·突变	80-285	双月刊	60	www.egh.net.cn	cemscm@stu.edu.cn
动物学研究	64-20	双月刊	150	www.zoores.ac.cn	zoores@mail.kiz.ac.cn
动物学杂志	2-422	双月刊	360	http://dwzz.ioz.ac.cn	journal@ioz.ac.cn
分子植物育种	84-23	双月刊	240	www.molplantbreed.org	mpb@hibio.org
国际遗传学杂志	14-55	双月刊	90	www.cma.org.cn	genetics@ems.hrbmu.edu.cn
激光生物学报	42-194	双月刊	150	www.jgswxb.net	jgswxb@hunnu.edu.cn
菌物学报	2-499	双月刊	480	http://journals.im.ac.cn/jwxtcn	jwxt@im.ac.cn
昆虫知识	2-151	双月刊	360	www.ent-bull.com.cn	entom@ioz.ac.cn
林业科学	82-6	月刊	300	www.linyekexue.net	linyxx@forestry.ac.cn
农业生物技术学报	2-367	双月刊	240	www.jabiotech.org.cn/	nsjxb@cau.edu.cn
人类学学报	2-384	季刊	100	www.ivpp.ac.cn	acta@ivpp.ac.cn
生命科学	4-628	月刊	480	www.lifescience.net.cn	cbis@sibs.ac.cn
生命科学研究	42-172	双月刊	108	http://smky.chinajournal.net.cn	life@hunnu.edu.cn
生物工程学报	82-13	月刊	780	http://journals.im.ac.cn/cjbcn	cjb@im.ac.cn
生物化学与生物物理进展	2-816	月刊	720	www.pibb.ac.cn	prog@sun5.ibp.ac.cn
生物技术通报	18-92	月刊	300		biotech@mail.caas.net.cn
生物技术通讯	82-196	双月刊	150	http://swtx.chinajournal.net.cn	swtx@263.net
微生物学报	2-504	月刊	660	http://journals.im.ac.cn/actamicrocn/	actamicro@im.ac.cn
微生物学通报	2-817	月刊	576	http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn	tongbao@im.ac.cn
武汉植物学研究	38-103	双月刊	180	http://whzwxjy.cn	editor@rose.whiob.ac.cn
畜牧兽医学报	82-453	月刊	360	www.xmsyxb.com	xmsyxb@263.net
遗传	2-810	月刊	600	www.chinagene.cn	yczz@genetics.ac.cn
遗传学报	2-819	月刊	600	www.jgenetgenomics.org	jgg@genetics.ac.cn
云南植物研究	64-11	双月刊	150	http://journal.kib.ac.cn	bianji@mail.kib.ac.cn
植物遗传资源学报	82-643	双月刊	120	www.zwyczy.cn	zwyczyxb2003@163.com
植物学报	2-967	双月刊	480	www.chinbullbotany.com	cbb@ibcas.ac.cn
中国实验动物学报	2-748	双月刊	120	www.calas.org.cn	A67761337@126.com
中国生态农业学报	82-973	双月刊	210	www.ecoagri.ac.cn	editor@sjziam.ac.cn
中国生物工程杂志	82-673	月刊	960	www.biotech.ac.cn	biotech@mail.las.ac.cn
中国水产科学	18-250	双月刊	180	www.fishscichina.com	zgscckx@cafs.ac.cn
中国水稻科学	32-94	双月刊	120	www.ricesci.cn	cjrs@263.net
作物学报	82-336	月刊	600	www.chinacrops.org/zwx	xbzw@chinajournal.net.cn